

Mikrokalorimetrija

M. Flögel

Institut za fizikalnu kemiju Sveučilišta u Zagrebu,
Zagreb

DK 536.6



MIRNA FLÖGEL rođena je u Vinkovcima. Diplomirala je godine 1962. na Tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (KTO). Postdiplomski studij iz »Fizikalnih metoda u kemiji« završila je 1964. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Na istom je fakultetu doktorirala 1967, na području kinetike i mehanizma oktaedralnih supstitucija. Od 1970. do 1971. boravi kao Fulbrightov stipendist na Johns Hopkins University, Baltimore, SAD, na postdoktorskom

studiju s područja termodinamike i mehanizma proteinskih reakcija.

Radi kao suradnik Instituta za fizikalnu kemiju i Instituta za organsku kemiju i biokemiju Sveučilišta u Zagrebu.

Osnovna znanstvena područja: kinetika i mehanizam oktaedralnih supstitucija; kinetika, termodinamika i mehanizam enzimskih reakcija.

UVOD

Kalorimetrija, koja je do nedavna bila rijetko u upotrebi, dosegla je danas stupanj razvoja koji tu metodu čini istraživačkim oruđem koje mnogo obećaje na brojnim područjima kemije, biokemije i biologije. U ovom članku opisat će se kratko suvremeni mikrokalorimetrijski uređaji, principi na kojima se oni osnivaju te područja primjene mikrokalorimetrijske metode, koja se u novije vrijeme naglo šire i sve češće pojavljuju u literaturi.

Dok su druge analitičke metode fantastično unapredovale u posljednjih dvadeset i pet godina, gotovo začuđuje kako se kalorimetrija znatno teže probijala u red modernih istraživačkih tehnika, jer je upravo ona jedno od primarnih oruđa koje može pomoći pri studiju kemijskih događaja, objašnjavajući njihove uzroke i efekte. Razlog vjerojatno leži u tome što je klasična kalorimetrija za-

htijevala velike količine tvari za ispitivanje, a većina preciznih uređaja za kalorimetrijska mjerenja bila je sagrađena za specifične svrhe pojedinih laboratorija. Ipak, zanimljivo je napomenuti da kalorimetar kao znanstveni instrument postoji još od kraja 18. stoljeća. U to rano doba služio je za studiranje prirode topline, a u devetnaestom stoljeću prvi puta je primijenjen u biologiji (Crawfords, Lavoisier i Laplace su studirali toplinske efekte disanja 1870). Kasnije, kad je priroda topline bila definirana, kalorimetrija je bila izgubila svoje ugledno mjesto u znanstvenom radu, iako se kao fizikalno-kemijska tehnika zadržala u upotrebi za studij termodinamičkih svojstava kemijskih spojeva.

Moderna kalorimetrija ubraja se među vrlo važne analitičke metode. Njezina osjetljivost može se uspoređivati sa spektrofotometrijskom, a njezina prednost leži u tome što uzorci koji se studiraju mogu biti pored pravih otopina i krutine, suspenzije ili višefazni sistemi. Kalorimetrija je također osnovno oruđe za rješavanje pitanja kemijske termodinamike. Toplinski sadržaj (entalpija) je veličina koja je karakteristična i konstantna za određenu tvar, kao što je i njezina molekularna težina. Odredi li se još i pokretačka sila reakcije (Gibbsova slobodna energija) i izračuna promjena entropije, termodinamička slika reakcije upotpunjena je, a takvo znanje značajno je jednako za kemičara i biokemičara. Kad se jednom izmjeri toplina određene reakcije, ona se može primjenjivati direktno za analitičke svrhe prilikom svakoga daljnijeg kalorimetrijskog pristupa istom reakcijskom sistemu a da se ne pita što je tu toplinu uzrokovalo. Tako kalorimetrija postaje elegantno analitičko pomagalo. Želi li se na temelju izmjerenje topline graditi cijela termodinamička slika reakcije te tražiti veza između strukturnih promjena studiranih tvari i termodinamičkih parametara, ulazi se u vrstu istraživanja koja će pružiti još nedovoljno sagledano mnoštvo korisnih informacija o kompliciranim kemijskim i biokemijskim procesima.

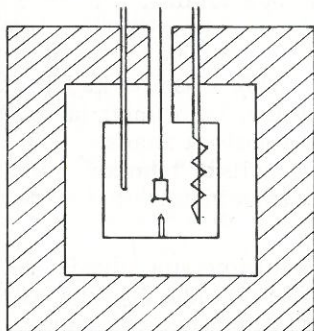
Do sada su se topline reakcija u većini slučajeva određivale indirektno na temelju van't Hoffovih dijagrama, no tako određene entalpije nisu uvijek jednoznačne vrijednosti za izvođenje mehanističkih zaključaka, osobito kad se radi o biokemijskim procesima. Danas se toplina reakcije može mjeriti i onda kad je malena, pa i onda kad se raspolaze samo s mikromolarnom količinom ispitivane tvari.

OSNOVNI KALORIMETRIJSKI PRINCIPI

Iako će se ovdje ograničiti na detaljan opis komercijalno pristupačnih mikrokolorimetara, ipak će se spomenuti i osnovni principi drugih kalorimetrijskih uređaja koji su do danas bili ili jesu u upotrebi.

Pet je različitih principa na kojima su kalorimetri građeni:

1. izoperibolni kalorimetri ili kalorimetri s okolinom stalne temperature,
2. kalorimetri na osnovi prijelaza agregatnih stanja,
3. kalorimetri s termoelektričnom pumpom,
4. adijabatski kalorimetri i
5. kondukcijski kalorimetri.



Slika 1 — Shematski prikaz izoperibolnog kalorimetra s okolinom stalne temperature

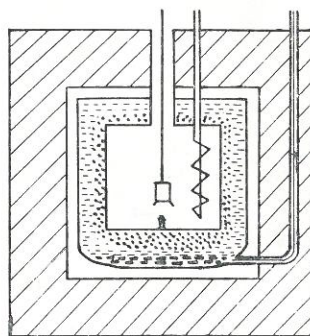
Na slici 1 prikazan je *izoperibolni kalorimetar* s okolinom stalne temperature. Princip na kojem je građen vrlo je jednostavan i u mnogo slučajeva najprikladniji za upotrebu. U taj tip kalorimetra pripada Dewarov kalorimetar i LKB-precizni kalorimetar. Osnovni dijelovi izoperibolnog kalorimetra su reakcijska posuda snabdjevena nekim temperaturnim osjetilom (termistor, jedan ili više termoparova), miješalicom, kalibriranom grijalicom i uređajem za otpočinjanje reakcije (npr. uređaj za razbijanje ampule).

Kalorimetrijska posuda uronjena je u termostiranu kupelj i tako je termički izolirana od okoline. Ako se prilikom reakcije toplina razvije ili apsorbira, u kalorimetrijskoj će jedinici doći do promjene temperature. Kad bi temperatura okoline točno slijedila temperaturu kalorimetra, ne bi došlo do izmjene topline između reakcijske posude i izolacijskog plašta, i tada bi to bio adijabatski sistem. Kod izoperibolnog kalouimetra postoji

temperaturna razlika između kalorimetrijske posude i okoline, pa valja voditi računa o izmjeni topline. Ako je studirana reakcija endotermna, temperaturna promjena može se kompenzirati oslobađanjem odgovarajuće električne energije unutar kalorimetrijske jedinice. Ako je endotermni proces potpuno kompenziran, neće uopće doći do izmjene topline s okolinom, a količina apsorbirane topline u studiranom procesu bit će jednaka dovedenoj električnoj energiji. Pri takvom eksperimentu termometar u kalorimetrijskoj jedinici ne upotrebljava se za mjerenje temperaturnih promjena, nego za kontrolu izotermnih i adijabatskih uvjeta.

Prilikom egzotermnih reakcija korekcije za izmjenju topline s okolinom su neophodno potrebne. Obično se za to primjenjuje Newtonov zakon hlađenja u obliku Regnault-Pfaundlerove jednadžbe¹⁻³.

Izoperibolni kalorimetri najčešće služe kao reakcijski kalorimetri, kalorimetri za mjerenje toplina otapanja ili sagorijevanja, a u najnovije vrijeme postoji i mikrokolorimetrijska verzija izoperibolnog kalorimetra samo za studiranje endotermnih reakcija u otopini.

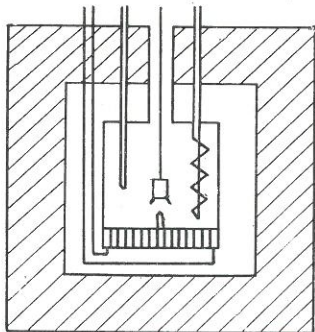


Slika 2 — Shematski prikaz Bunsenova kalorimetra

Na slici 2 prikazan je Bunsenov kalorimetar koji je građen na principu *prijelaza agregatnih stanja*. Kalorimetrijska posuda tijesno je priljubljena uz plašt ispunjen određenom čistom tvari, koja se nalazi u obliku ravnotežne smjese svoje tekuće i kristalne faze. U ravnotežnom stanju dvofazni sistem i kalorimetrijska jedinica čine izotermni sistem na temperaturi taljenja kristalne faze. Temperaturu okoline treba održavati na istoj temperaturi kao dvofazni plašt, jer se tako osiguravaju adijabatski uvjeti. Razvijena ili apsorbirana toplina prilikom reakcije u kalorimetrijskoj jedinici utječe na taljenje ili stvaranje kristalne faze u dvofaznom plaštu. Procese sledivanja ili otapanja prate promjene volumena, koje su proporcionalne toplini reakcije. Promjene volumena mjere se živinim manometrom. Prvi Bunsenov kalorimetar koristio je u svom dvofaznom plaštu smjesu vode i leda. Većina današnjih kalorimetara, građeni na tom principu, koristi u plaštu difeniloksid (difenileter), kojega je talište pri 26,87°C, dakle u blizini termokemijske referentne temperature (25°C). Kalorimetri s difeniloksidom osjetljiviji su

oko tri puta od »ledenih«. U nekim konstrukcijama dvofaznih kalorimetara upotrebljavao se i sistem tekuća — plinovita faza⁴.

Velika je mana Bunsenovih kalorimetara fiksirana radna temperatura, pa se danas takvi kalorimetri sve rjeđe upotrebljavaju. Prednost im je velika osjetljivost pri studiju toplina koje su vezane uz spore procese.



Slika 3 — Shematski prikaz kalorimetra na principu termoelektrične pumpe

Na slici 3 shematski je prikazan kalorimetar na principu termoelektrične pumpe. Dok se temperaturne promjene pri endotermnom procesu lako mogu kompenzirati dodavanjem električne energije, znatno je teže kompenzirati temperaturne promjene pri egzotermnom procesu. Postoji ipak mogućnost da se toplina razvijena u toku egzotermnog kemijskog procesa odvede uz pomoć termoelektričnog hladila koje radi na principu Peltierova efekta. Takav se uređaj naziva termoelektričnom pumpom: ona prenosi razvijenu toplinu iz reakcijske posude u okolnu termostatisiranu kupelj.

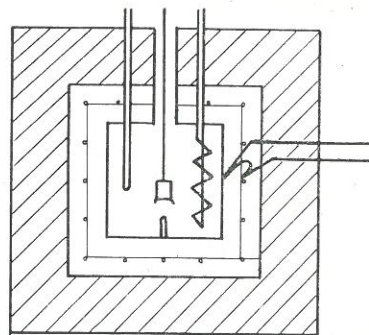
Interes za kalorimetrijske uređaje na opisanom principu znatno je porastao otkako se za elemente Peltierova efekta upotrebljavaju poluvodiči. Dok izoperibolni kalorimetar precizno radi samo prilikom studija endotermnih procesa, jer je teško izvršiti potrebne korekcije za izmjenu topline s okolinom, kalorimetar na principu termoelektrične pumpe omogućuje električnu kompenzaciju jednako za procese kod kojih se toplina apsorbira i procese kod kojih se toplina razvija. Peltierova pumpa postavljena je između kalorimetrijske jedinice i okolne termostatisirane kupelji. Efekt hlađenja ($-w$) pri svakom spoju proporcionalan je struji (i) kroz termočlanak.

$$-w = \pi \cdot i$$

U praksi rashladnom efektu suprotstavlja se Jouleov efekt grijanja Ri^2 , koji se pokazuje uzduž cijeloga strujnog kruga. Takav Jouleov efekt djelomično se prenosi na spojevima i ovisan je o efektivnom otporu spoja (r).

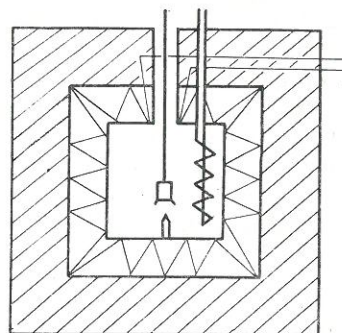
$$-w = \pi \cdot i - r \cdot i^2$$

Ako termočlanak ne okružuje potpuno kalorimetrijsku posudu, osobitu pažnju treba posvetiti dobrom miješanju.



Slika 4 — Shematski prikaz adijabatskog kalorimetra

Slika 4 pokazuje adijabatski kalorimetar. Izjednačuje li se temperatura okoline konstantno s temperaturom kalorimetrijske posude, neće doći do izmjene topline. Kod egzotermnih procesa to se postiže ugrađivanjem adijabatskog štitnika između kalorimetrijske jedinice i termostatisirane kupelji. Temperaturna razlika između adijabatskog štitnika i reakcijske posude stalno se drži na nuli razvijanjem odgovarajuće topline pomoću grijača u štitniku. Razlika u temperaturi kontrolira se termostatom, a u modernim konstrukcijama toga tipa kalorimetra efekt štitnika regulira se automatski. Princip adijabatskog štitnika koristi se u mnogim vrlo važnim kalorimetrijskim uređajima, posebno onim koji su namijenjeni studiju dugotrajnih procesa pri temperaturama znatno različitim od sobne. Ovamo pripadaju npr. kalorimetri za mjerenje toplinskog kapaciteta pri niskim temperaturama. Kalorimetri s adijabatskim štitnikom neke su vrsti komplementarni uređaji izoperibolnim kalorimetrima.



Slika 5 — Shematski prikaz kondukcijskog kalorimetra

Slika 5 prikazuje primjer kondukcijskog kalorimetra, građenog na principu termoelektrične kondukcije (»heat leakage«-princip). Kod takvih kalorimetrijskih uređaja obično dolazi do vrlo brzog prijenosa topline između kalorimetrijske jedinice i toplinskog spremnika, bez obzira je li studiran proces endo- ili egzoterman. Važno je da sva toplina koja prijeđe u bilo kojem smjeru bude registrirana.

na. U praksi se to obično omogućuje okruživanjem kalorimetrijske posude serijom termoparova. Toplinski tok između reakcijske posude i okoline proporcionalan je razlici njihovih srednjih temperatura:

$$\frac{dQ}{t} = K_1 \cdot \Delta T_m$$

Budući da je i napon termočlanka proporcionalan istoj temperaturnoj razlici ($V = K_2 \cdot \Delta T_m$), slijedi da je toplinski tok $dQ = K V dt$, odnosno da je ukupni prijelaz topline

$$Q = K \int V dt$$

Kako se promjena napona u većini modernih uređaja automatski registrira, integral $\int V dt$ jednak je površini ispod zabilježene krivulje s koordinatama napon i vrijeme. Princip termoelektrične kondukcije bio je najpopularniji prilikom konstrukcije mikrokalorimetrijskih uređaja. Nalazi se u Tian-Calvetovu kalorimetru u kombinaciji s principom termoelektrične pumpe, u Benzingerovu (Beckmanovu) i LKB-mikrokalorimetrima.

OSNOVNI KALORIMETRIJSKI UREĐAJI

Zatvoreni i otvoreni kalorimetri

Zatvorena reakcijska posuda obično ima oblik bombe koja se može oduprijeti pritisku od nekoliko atmosfera. Najpoznatiji predstavnik zatvorenog tipa kalorimetra je kalorimetar za mjerenje toplina sagorijevanja. U zatvorenom kalorimetarskom bloku volumen je konstantan i zbog toga će izmjerena toplina određenog procesa biti u stvari jednaka promjeni unutrašnje energije sistema. Većina kalorimetara otvoreni su sistemi, kod kojih se sadržaj kalorimetrijske posude nalazi na atmosferskom pritisku, a kalorimetrijsko se mjerenje izvodi pri konstantnom pritisku. U otvorenom sistemu izmjerena toplina reakcije jednaka je promjeni entalpije. Razlika između promjene unutrašnje energije ΔU i promjene entalpije ΔH bit će značajna samo kod procesa u kojima sudjeluju plinovi, tj. kod procesa kod kojih se plinovi stvaraju ili apsorbiraju.

Kalorimetri s jednom ili dvije kalorimetrijske jedinice

Kalorimetrijski uređaj može imati jednu ili dvije kalorimetrijske jedinice. Dok je sistem s jednom jedinicom mehanički veoma jednostavan, kompliciraniji dvojedinični sistem daleko ga nadmašuje svojim prednostima. U mikrokalorimetrijskim uređajima, gdje se traži izuzetna osjetljivost mjerenja, naći će se samo dvojedinični (diferencijalni) sistem.

Proces koji se studira može se odvijati samo u jednoj od kalorimetrijskih posuda, dok je druga napunjena referentnim ili inertnim sistemom. Ako su dvije kalorimetrijske posude izgrađene kao savršeni dvojnici, može se očekivati da će smetnje što ih uzrokuje okolina jednako djelovati na obje

posude. Kako se prilikom mjerenja registrira u stvari diferencijalni signal između dviju serija termoparova, koje pripadaju dvjema kalorimetrijskim jedinicama, smetnje okoline bit će isključene. U diferencijalnom kalorimetru može se istovremeno izvoditi reakcija u jednoj posudi, a proces otapanja u drugoj.

Katkad se takav kalorimetar upotrebljava kao termička vaga. Egzotermni proces, koji se odvija u jednoj posudi, može se simulirati u drugoj dovođenjem električne energije, tako da temperatura obje posuda bude jednaka. U slučaju savršenih dvojnika toplina dovedena referentnoj kalorimetrijskoj jedinici bit će jednaka razvijenoj toplini u reakcijskoj posudi, a pri tome će opet smetnje okoline biti isključene.

Kalorimetri s jednokratnim punjenjem i protočni kalorimetri

Žele li se pri kalorimetrijskom eksperimentu pomiješati dvije ili više reakcijskih komponenta, čini se to obično metodom razbijanja ampule, prikladno konstruiranom biretom ili miješanjem sadržaja dvaju odijeljenih pretinaca. Takvi postupci nazivaju se postupcima s jednokratnim (diskretnim) punjenjem (»batch«-postupci).

Druga je mogućnost da se reakcijske komponente pomiješaju uz pomoć tehnike kontinuiranog ili zaustavljenog toka (»stopped flow«). Protočno miješanje ima mnoge prednosti i danas se na području mikrokalorimetrije takva tehnika često koristi, osobito prilikom primjene kalorimetrijskih mjerenja za analitičke svrhe. Protočni kalorimetri bit će mnogo prikladniji za automatsko rukovanje od kalorimetra s jednokratnim punjenjem, a u budućnosti, vjeruje se, imat će i takvu osjetljivost i točnost kao »batch«-uređaji.

Kritični dio kalorimetra s jednokratnim punjenjem jest uređaj za otpočinjanje reakcije. Konstrukcija tog uređaja osobito je važna kod mikrokalorimetrijskih instrumenata.

Suvremeni uređaji, za koje se smatra da uzrokuju minimalne termičke smetnje, sadržavaju otvorene pretince, u kojima se reakcijske otopine nalaze odijeljene prije reakcije, a miješanje se postiže rotiranjem cijeloga kalorimetrijskog bloka. U takvu uređaju reakcijska posuda sadržava prilično veliku količinu plinovite faze, koja može izazvati komplikacije pri mjerenju toplina miješanja ili razrjeđivanja. U protočnom kalorimetru obično nema plinovite faze, pa su takvi instrumenti upravo idealni za mjerenja toplina miješanja i razrjeđivanja.

Ako se radi s vrlo razrijeđenim otopinama, kod uređaja s diskretnim punjenjem mogu doći do izražaja i efekti adsorpcije. Prilikom protočnog postupka uspostaviti će se određeno stacionarno stanje (»steady state«) i površinski efekti bit će isključeni.

Kalorimetrijska mjerenja na »batch«-uređaju mogu se provoditi pri reakcijskim procesima koji su trenutačni jednako kao pri dugotrajnima. Pri upotrebi protočnog kalorimetra obično se zahtijeva da se reakcija završi unutar kalorimetrijske je-

u
er-
rij-
če-
to-
ro-

kao
ija
do-
tu-
nih
ne-
i u
o-

ntu
na-
ile,
em
po-
nim

po-
nog
čno
po-
ko-
kih
etri-
va-
t, a
lji-

ije-
on-
ro-

ro-
o-
ine
po-
ka.
pri-
e i-
ša-
t o-
en-
ja i

kod
iz-
po-
sta-
lju-

aju
koji
Pri-
ije-
je-

dinice u kojoj dolazi do miješanja, što drugim riječima znači da reakcijsko vrijeme studirane reakcije mora biti kratko u usporedbi s vremenom zadržavanja reakcijske smjese u reakcijskoj posudi. Uz pomoć protočnog kalorimetra mogu se također izvesti pokusi zaustavljanjem toka («stopped flow»). U takvim eksperimentima, jednako kao kod »batch«-mjerjenja, reakcijsko vrijeme nije kritično, ali točnost mjerenja bit će znatno smanjena u usporedbi s eksperimentima s kontinuiranim tokom.

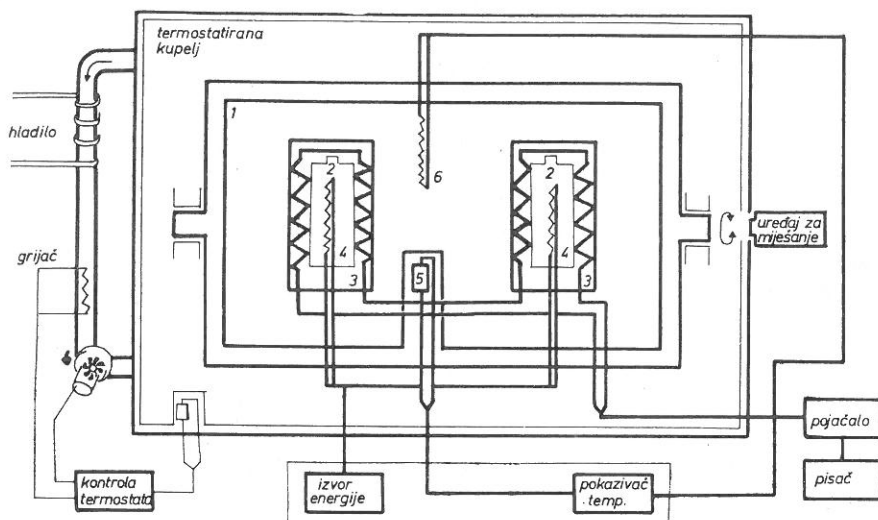
PRIMJERI MIKROKALORIMETRIJSKIH UREĐAJA NA TRŽIŠTU

U posljednjih nekoliko godina mikrokalorimetrijska instrumentacija naglo se razvija. Većina komercijalnih uređaja oblikovana je za rad u biokemiji i biologiji. Smatra se da će mikrokalorimetrija u toku sedamdesetih godina postati osnovno istraživačko pomagalo u životopisnim znanostima. Među najpoznatije mikrokalorimetre pripada Calvetov mikrokalorimetar, koji se razvio iz Tianova

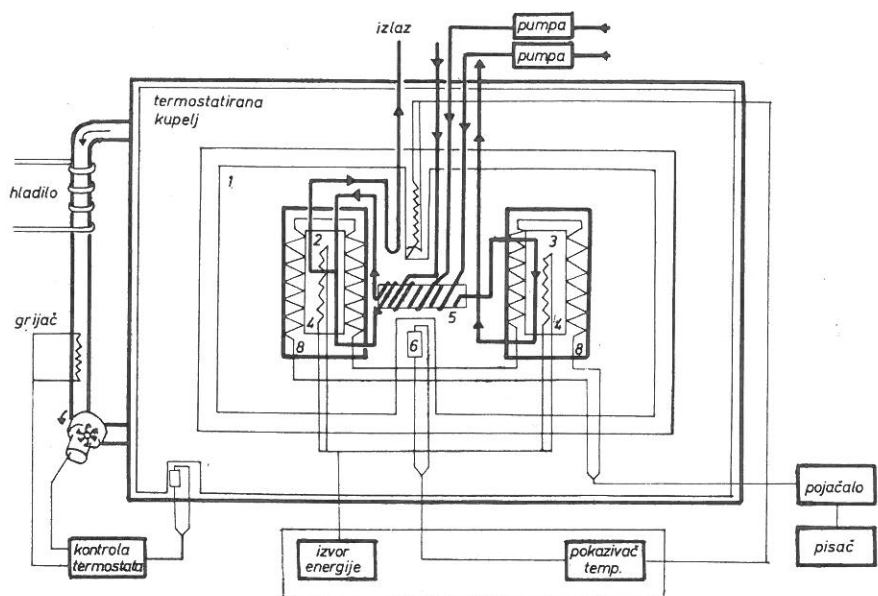
kalorimetra, a proizvodi ga Setaram, Lyon, Francuska, zatim Benzingerov kalorimetar, što ga proizvodi Beckman Instruments Co., Science Division, Palo Alto, Calif., SAD, i konačno LKB-mikrokolorimetri koje proizvodi LKB-Produktor, Stockholm-Bromma, Švedska, a danas su najsavršeniji mikrokolorimetrijski uređaji, građeni na iskustvima Calveta, Prata, Benzingera, Kitzingera i Wadsöa.

Na slici 6 prikazan je LKB-»batch«-mikrokolorimetar, a na slici 7 protočni LKB-mikrokolorimetar. Oba kalorimetra građena su na principu termoelektrične kondukcije s dvije kalorimetrijske jedinice. U tim kalorimetrima prijelaz topline između kalorimetrijskih jedinica i okoline zbiva se brzo preko pločica termoparova i zbog toga nije potrebno hlađenje na osnovi Peltierova efekta kao kod mnogih drugih komercijalnih uređaja.

Kod kalorimetra s jednokratnim punjenjem reakcijski se prostor sastoji od dviju jednakih posuda u obliku prizme ili kocke, od kojih je svaka do određene visine pregrađena zidom, tako da sadržava dva pretinca, jedan od 2,5 i drugi od 5 mililitara.



Slika 6 — Shematski prikaz LKB-mikrokolorimetra s jednokratnim punjenjem



Slika 7 — Shematski prikaz LKB-protočnog mikrokolorimetra

Svakoj kalorimetrijskoj jedinici pripada jedna takva reakcijska posuda. Reakcijske posude građene su ili od Pyrex-stakla ili od 18-karatnog zlata. One su u tijesnom termičkom kontaktu s termoparovima. Termoparovi oko svake reakcijske posude spojeni su međusobno u seriju, a dvije postojeće serije dviju kalorimetrijskih jedinica spojene su jedna nasuprot drugoj. Pločice termoparova su poluvodička, tzv. termoelektrična hladila, a odlikuju se visokom toplinskom vodljivošću i niskim električnim otporom, što olakšava električno pojačavanje. Metalni blok, koji okružuje dvije kalorimetrijske jedinice, izoliran je stiroporom i prekrit čeličnim plaštem. Takav kalorimetrijski blok uronjen je u termostatiranu zračnu kupelj.

Reagensi, koji su se u početku nalazili u odvojenim odjeljcima jedne reakcijske posude, miješaju se rotacijom cijeloga kalorimetrijskog bloka. Instrument se kalibrira električki, dovodenjem poznate količine Jouleove topline. Grijač za električku kalibraciju smješten je na pregradni zid unutar reakcijske posude. Razlika u naponu između termočlanaka reakcijske i referentne jedinice bilježi se pisačem nakon prethodnog pojačavanja. Ona je direktno proporcionalna toplini reakcije.

$$Q = \int_0^{\infty} dQ = K \int_0^{\infty} V dt$$

Uređaj za bilježenje signala s koordinatama napon-vrijeme snabdjeven je i integratorom, tako da se izmjerena toplina reakcije dobiva direktno množenjem integrirane krivulje napon-vrijeme kalibracijskom konstantom. Osjetljivost tog mikrokolorimetra je $10 \mu\text{cal}$, a točnost mjerenja $\pm 0,1$ do $0,3\%$, ovisno o trajanju eksperimenta i ukupnoj izmjerenoj toplini. Vrijeme uravnoteženja sistema od unošenja reaktanata u odijeljene pretince reakcijske posude do započinjanja reakcije varira od 40 do 90 minuta. Temperaturna stabilnost zračne kupelji je $\pm 0,001^\circ$ ako sobna temperatura ne varira za više od $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Za pravilan rad tog instrumenta vrlo je važno dobro termostatiranje prostorije u kojoj se instrument nalazi.

Protočni LKB-mikrokolorimetar građen je u principu analogno »batch«-mikrokolorimetru. On sadržava pored kalorimetrijskih jedinica i jedinicu za izmjenu topline koja je smještena u metalnom bloku. Jedinica za izmjenu topline građena je od zlatnih cijevi ugrađenih u metalni blok, tako da su u dobrom kontaktu s glavnim toplinskim spremnikom. Obje reakcijske posude su protočne. Jedna je tzv. jedinica za mjerenje toplina miješanja, a druga za mjerenje toplina u toku protoka. Prva se upotrebljava za studiranje toplina brzih reakcija i toplina miješanja, dok se druga upotrebljava za spore procese, započete izvan kalorimetra. Reakcijski uzorci upumpavaju se u jednu od kalorimetrijskih jedinica preko jedinice za izmjenu topline pomoću pumpa kojima se osigurava konstantna brzina protoka, ali tako da se ta brzina može po volji odabrati.

Naponski signal, koji se automatski bilježi za vrijeme eksperimenta, jest diferencijalni signal između dviju kalorimetrijskih jedinica, a zabilježen je kao pomak referentne crte koja odgovara naponskoj razlici nula. Taj pomak direktno je proporcionalan toplinskom efektu studirane reakcije (slika 8)

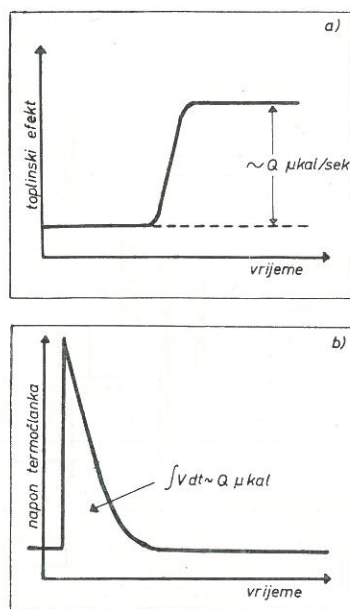
$$\left(\frac{dQ}{dt}\right)_{\text{ulaz}} = Q \left(\frac{\text{cal}}{\text{ml}}\right) \cdot F \left(\frac{\text{ml}}{\text{s}}\right)$$

$$\left(\frac{dQ}{dt}\right)_{\text{izlaz}} = \beta \Delta T = K \cdot V$$

Kod uspostavljenog stacionarnog stanja

$$\left(\frac{dQ}{dt}\right)_{\text{ulaz}} = \left(\frac{dQ}{dt}\right)_{\text{izlaz}} = Q \cdot F = K \cdot V$$

$$Q \left(\frac{\text{cal}}{\text{ml}}\right) = \frac{K}{F} \cdot V$$



Slika 8 — Primjeri eksperimentalnih krivulja dobivenih pri radu s

- a) LKB-protocnim mikrokolorimetrom
b) LKB-mikrokolorimetrom s jednokratnim punjenjem

Ako je poznata brzina protoka (F) i koncentracija tvari u reakcijskim otopinama, može se izračunati količina reaktanata koji se miješaju u jednoj sekundi, a znajući taj podatak, izračunava se na temelju izmjerenog toplinskog efekta toplina reakcije po molu ili gramu reaktanta.

Osjetljivost tog kalorimetra je $0,1 \text{ cal/s}$, točnost mjerenja oko 1% , a trajanje jednog eksperimenta oko 15 minuta. Kako reaktanti postižu željenu radnu temperaturu u toku prijelaza preko jedinice za izmjenu topline, kvaliteta rada tog instrumenta ne ovisi o varijacijama sobne temperature.

Pored spomenutih mikrokolorimetara postoje još mnoge varijante preciznih kalorimetrijskih uređaja, sagrađenih u pojedinim laboratorijima, i opisanih u brojnim primarnim publikacijama, koji

osim visoke osjetljivosti pružaju i niz drugih zanimljivih mogućnosti. Takvi su npr. kalorimetri za direktno mjerenje toplinskog kapaciteta bilo na osnovi klizne temperature ili nagle promjene temperature. Ti kalorimetri nisu pobliže opisani, jer su građeni na opisanim principima, a najčešće troše znatno više reakcijske otopine nego to dopušta današnja definicija mikrokolorimetrijskog uređaja.

Mikrokolorimetrom se smatra svaki onaj uređaj koji za rad ne treba više od mikromola ili nekoliko mikromolova reaktanata, radi s volumenima do 10 ml, registrira promjene temperature od 10^{-7} do 10^{-8} °C, a da ukupna izmjerena toplina pri jednom pokusu ne prelazi nekoliko milikalorija.

PRIMJENA MIKROKOLORIMETRIJE

Već je u uvodu naglašena dvostruka primjena mikrokolorimetrije, analitička i termodinamička. Koriste li se mikrokolorimetrijski rezultati za određivanje postotka reakcije, aktivnosti pojedinog reaktanta ili njegove čistoće, pristup izmjerenoj toplini je analitički. Analiziraju li se kalorijski rezultati u smislu određivanja termodinamičkih parametara, promjene entalpije, entropije i slobodne energije, te toplinskog kapaciteta određenog reakcijskog sistema ili promjene parcijalnog molnog kapaciteta određene reakcijske komponente, i ako se na temelju tih parametara stvaraju određeni strukturni ili mehanistički zaključci, pristup mikrokolorimetriji je termodinamički.

Kolorimetrija kao termodinamičko oruđe

Termodinamička veličina koja se kalorimetrijski najčešće određuje jest promjena entalpije. ΔH . Odredi li se ΔH pri različitim temperaturama, može se izračunati promjena toplinskog kapaciteta, ΔC_p .

$$\Delta C_p = \frac{d \Delta H}{dT}$$

Toplinski kapacitet pri konstantnom pritisku C_p obično se određuje mjerenjem promjene temperature uzrokovane dodatkom poznate količine električne energije Q .

$$C_p = \frac{Q}{\Delta T}$$

Zbroj toplinskog kapaciteta određene čiste tvari i promjene toplinskog kapaciteta prilikom reakcije otapanja te tvari jednak je prividnom toplinskom kapacitetu te tvari u otopini, ΦC_p .

$$\Phi C_p = C_p + \Delta C_p$$

Mjerenjem te veličine u ovisnosti o koncentraciji otopljene tvari može se odrediti parcijalni molni toplinski kapacitet određene tvari pri neizmjenjivom razrjeđenju, \bar{C}_p^0 .

Entropijske vrijednosti procesa koji se zbivaju u otopinama obično se izvode iz ravnotežnih podataka i entalpijskih vrijednosti.

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (K = \text{konstanta ravnoteže})$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0$$

Promjene entalpije mogu se odrediti na dva načina: kalorimetrijski i na temelju mjerenja konstanti ravnoteže pri različitim temperaturama.

Do sada je općenito razmatrano koje se termodinamičke veličine mogu izmjeriti ili izračunati na temelju izmjerenih podataka. Treba još ukratko prikazati što te veličine znače u osvjetljavanju mehanizma studiranih reakcija ili struktura pojedinih kompliciranih spojeva. Entalpija određene reakcije karakteristična je veličina za tu reakciju i zbog toga ta veličina ima isključivo analitičko značenje pri termodinamičkoj analizi procesa. Izmjerena promjena entalpije određene reakcije jednaka je zbroju entalpija svih parcijalnih procesa koji su se zbili u toku jednog mjerenja. Često se mijenjanjem reakcijskih uvjeta može rastaviti ukupna promjena entalpije na nekoliko entalpija definiranih procesa. Tako se, na primjer, pokazalo u kalorimetrijskom studiju inhibicije ribonukleaze A 3'-citiidinmonofosfatom⁹ da je ukupna promjena entalpije za tu reakciju jednaka zbroju promjena entalpija vezanih uz protoniranje enzima i vezivanje pirimidinske baze inhibitora, dok je ΔH vezivanja inhibitora fosfata zanemarljivo malena. ΔH protoniranja enzima rastavljena je dalje na temelju odgovarajućih kalorimetrijskih eksperimenata na ΔH vezivanja protona i ΔH vezan uz parcijalnu konformacijsku promjenu ribonukleaze A do koje dolazi prilikom protonacije.

Promjena toplinskog kapaciteta mnogo govori o interakciji tvari i otapala. Nađeno je, na primjer, da je ΔC_p^0 za prijenos molekule alifatskog ugljikovodika iz plinovitog stanja u vodenu otopinu uglavnom proporcionalna dužini alifatskog lanca. Tako je ΔC_p^0 neke vrste mjera za hidrofobnost ima li se u vidu da su alifatski ugljikovodici izrazito hidrofobni. Relacije ΔC_p^0 i hidrofobnosti mnogo se primjenjuju u analiziranju strukturnih svojstava proteina^{10, 53} ($\Delta C_p^0 = -2\gamma(T + 3\delta T^2)$).

Izvanredno je zanimljiv odnos van't Hoffove entalpije i entalpije određene kalorimetrijski pri studiju termičkih prijelaza konformacija proteina i nukleinskih kiselina. Slaganje tih dviju entalpija smatra se dokazom da je prijelaz smotane konformacije u izduženu direktan, a ne postupan, tj. da su u svakom času zastupljene samo smotana i razmotana konformacija, dok su populacije polusmotanih konformacija praktički jednake nuli¹¹.

Kolorimetrijska mjerenja nadalje služe za studiranje ravnotežnih procesa i određivanje njihovih konstanti ravnoteže, za određivanje stehiometrijskog odnosa reakcijskih komponenata koje ulaze u ravnotežu. Kako je izmjerena toplina reakcije direktna mjera podmaklosti reakcije, a položaj ravnoteže mijenja se promjenom koncentracije reakcijskih komponenata, moguće je na temelju ovisnosti topline reakcije o koncentraciji jednog reaktanta (dok je koncentracija drugog reaktanta stalna) odrediti i promjenu entalpije i konstantu ravnoteže za određeni proces.

$$\frac{1}{Q} = \frac{1}{Q_{\text{maks.}}} + \frac{1}{Q_{\text{maks.}} K [R_s']}$$

gdje je Q izmjerena toplina reakcije za određenu slobodnu koncentraciju reaktanta R' . $Q_{\text{maks.}}$ je ekstrapolirana vrijednost od Q za neizmjerenu slobodnu koncentraciju reaktanta R' . Slobodna koncentracija reaktanta R' definirana je izrazom

$$[R_s''] = [R_u'] - n \frac{Q}{Q_{\text{maks.}}} [R_u'']$$

gdje je $[R_u']$ ukupna koncentracija reaktanta R' , a $[R_u'']$ ukupna koncentracija reaktanta R'' . Ravnotežna konstanta K izražena je kao konstanta disocijacije kompleksa $R'R''$.

Takva mjerenja najčešće se primjenjuju pri studiju inhibicije enzima^{12, 13} te u kemiji kompleksnih spojeva.

Pri studiju reakcija u kojima se male molekule vežu na makromolekulu često se javlja problem određivanja njihova stehiometrijskog odnosa. Uz pretpostavku da postoji n ekvivalentnih i nezavisnih mjesta vezivanja na makromolekuli, kalorimetrija omogućuje da se jednoznačno i vrlo jednostavno riješi pitanje stehiometrijskog odnosa. Najprije se odredi promjena entalpije reakcije, ΔH_m , na bazi eksperimenta u kojem se varira koncentracija male molekule, dok je koncentracija makromolekule stalna. Ta toplina reakcije odgovara potpunom zasićenju makromolekule malim molekulama. Zatim se određuje promjena entalpije reakcije, ΔH_M , variranjem koncentracije makromolekule, pri čemu je toplina reakcije računata po molu male molekule i odgovara dakle toplini vezivanja jedne male molekule na makromolekulu. Odnos tih dviju promjena entalpije definiran je izrazom

$$\Delta H_m = n \Delta H_M$$

gdje je n broj malih molekula vezanih na makromolekulu.

Zanimljivi se zaključci mogu izvoditi na temelju kalorimetrijskih titracija makromolekula, jer pojedine kemijski identične grupe imaju katkad različite topline protonacije i, ako su one bitno različite od tzv. normalne topline protoniranja studirane grupe, može se zaključiti da je uz proces protonacije vezana i određena konformacijska promjena.

Kalorimetrija kao analitičko oruđe

Već je rečeno da je razvijena ili apsorbirana količina topline određenog procesa u direktnom kvantitativnom odnosu s poodmaklosti i intenzitetom reakcije. Kako se s velikom točnošću mogu određivati veoma male količine topline, očito je da kalorimetrija predstavlja vrlo općenit analitički princip, koji se može primijeniti na sva područja kemijske i biokemijske analize. Važno svojstvo kalorimetrijske metode jest činjenica da turbiditet ili druge optičke smetnje ne predstavljaju zapreku pri kalorimetrijskim mjerenjima. Pri studiju biološkog materijala kalorimetrijski pristup je idealan, jer izmjereni rezultati izvire iz samoga studiranog objekta a da se nije dirnulo u

ispitivani sistem dodatkom stranih reagensa, radijacije ili sl. Budući da je kalorimetrija kao analitička metoda tako općenita, ona nije vrlo specifična metoda. Ta činjenica će katkad uzrokovati ograničenost praktične primjene te metode, međutim prilikom vrlo složenih procesa, kao što su biološki, nespecifični analitički pristup sadrži u sebi znatnu prednost. Na taj način mogu se otkriti nepoznati ili neočekivani efekti, koji bi ostali prikriiveni kojom usko specifičnom tehnikom.

Kalorimetar se može upotrebljavati kao analitički instrument prilikom kinetičkih ispitivanja. Jedini je zahtjev da kalorimetrijski uređaj registriira promjene znatno brže nego se zbiva studirana reakcija. Ukoliko se to ne može ostvariti, ponekad je moguće računski konstruirati kinetičku krivulju iz deformirane kalorimetrijske. Za vrlo brze procese primijenjuju se metode ustaljenog stanja («steady state»), koje omogućuju istovremeno mjerenje promjene entalpije i kinetike reakcije, čak i onda kad je poluvrijeme reakcije samo 10^{-3} sekundi.

Zanimljiva primjena mikrokalorimetrije za analitičke svrhe jest izvođenje kalorimetrijskih titracija proteina radi određivanja ionizacijskih konstanti prisutnih funkcionalnih grupa. Dok se titracijske krivulje pojedinih grupa na proteinu često prekrivaju i potencimetrijski se ne mogu razlučiti i odrediti pK_a -vrijednosti koje su vrlo blize, kombinacijom kalorimetrijske i potencimetrijske metode to je često moguće zbog bitno različitih toplina protonacije za različite funkcionalne grupe⁹.

Određivanje enzimске aktivnosti i čistoće enzima pripada svakako među vrlo važne primjene mikrokalorimetrije za analitičke svrhe. Metodu određivanja aktivnosti enzima upotrebom protočne mikrokalorimetrije razvili su Monk i Wadsö¹⁴. Osnovni pokus izvodi se tako da se otopina ili suspenzija enzima pomiješana sa suviškom odgovarajućeg supstrata upumpava u kalorimetrijsku jedinicu. U idealnom slučaju radi se o reakciji nultog reda, barem u određenom početnom vremenu, pa u toku protoka dolazi do uspostavljanja stacionarnog stanja. Toplinski efekt toga stacionarnog stanja prevodi se u signal pisača kao paralelni pomak osnovne crte duž naponske koordinate. Veličina pomaka direktno je proporcionalna toplinskom učinku i mjera je za enzimsku aktivnost u danim uvjetima eksperimenta.

Ista je metoda bila primijenjena za mjerenje inhibitornog djelovanja organofosfornih pesticida na aktivnost kolinesteraze¹⁵.

Boivinet i dr.¹⁶ određivali su kalorimetrijski metabolički efekt insulina na epidimalno masno tkivo štakora, što uopćeno pokazuje kako se mikrokalorimetrija može primijeniti za određivanje djelovanja raznih aktivatora ili retardacijskih agensa na životne procese.

Posebno treba istaći primjenu mikrokalorimetrije za kliničke svrhe. Izrađena je, na primjer, metoda za kvantitativno određivanje leukocita i trombocita u krvi²¹.

Kalorimetrija se pokazala kao vrijedan analitički instrument pri studiju procesa bakterijskog

rast
Pri
važn
kalo
volj
jem
uvje
rast
F
kalo
biol
sve
spoj
odn
noki
cins
no v
vezi
sku
anti
E
titi
mik
nom
trija
litičl

L i t e
1. J.
R.
te
2. J.
(U
Jc
3. H.
ri
ch
4. H.
Th
H.
st
5. P.
M
or

S a ž
živač
i kac
mikr
nih s
na k

rasta i reakcija između bakterija i antibiotika¹⁷. Pri promatranju rasta aerobnih bakterija vrlo je važno da se suspenzija bakterija prije uvođenja u kalorimetrijsku jedinicu prethodno pomiješa s dovoljno velikom količinom kisika, kako bi se za vrijeme ukupnog trajanja mjerenja osigurali aerobni uvjeti, jer se obično radi o kulturama koje brzo rastu i guste¹⁸.

Rast algi također je uspješno studiran mikrokalorimetrijski¹⁹. Pored primjene pri istraživanju bioloških procesa, mikrokalorimetrijom se autori sve češće služe pri studiju nastajanja kompleksnih spojeva. U to područje pripadaju radovi koji se odnose na kompleksno vezivanje bakra(II) na aminokiseline^{22, 23}, na nastajanje diglicinskih, triglicinskih i drugih kompleksa niklja²⁴, na kompleksno vezivanje magnezija na AMP, ADP i ATP²⁵, na vezivanje magnezija na fenilalanin-t-ribonukleinsku kiselinu, na vezivanje kalija i natrija na razne antibiotike^{20, 26, 27} i dr.

Budući da je u kratkom prikazu teško obuhvatiti sve do danas sagledane mogućnosti primjene mikrokalorimetrije, istaći će se na kraju još jednom osnovna područja u kojima se mikrokalorimetrija afirmirala kao znanstveno-istraživačka i analitička metoda:

- studij reakcija ionizacije (protoniranje amina^{28, 29}, ionizacija alifatskih karbonskih kiselina^{30, 31}, purina, pirimidina i njihovih nukleozida^{32, 33}, ribonukleinskih i dezoksiribonukleinskih kiselina³⁴, sekundarne ionizacije fosfata i karbonata³⁵), reakcija hidrolize³⁶⁻³⁸, oksidacije, polimerizacije³⁹ i nastajanja metalnih kompleksnih spojeva;
- studij inhibicije enzima i općenito reakcija proteina i malih molekula;
- studij konformacijskih prijelaza i promjena kod nukleinskih kiselina, polinukleotida i proteina⁴²⁻⁴⁶;
- studij procesa micelizacije³⁹ i s tim u vezi interakcije suprotno nabijenih deterdženata⁴⁰, i konačno
- studij procesa hidratacije i općenito solvatacije^{51, 52}, a već je naglašena izuzetna važnost mikrokalorimetrije pri studiju bioloških procesa.

Literatura

1. J. Coops, R. S. Jessup, K. van Ness, u F. D. Rossini (Uredn.), *Experimental Thermochemistry*, Interscience Publ., New York, 1956.
2. J. M. Sturtevant, *Calorimetry*, u A. Weissberger (Uredn.), *Techniques of Organic Chemistry*, Vol. I, Part I, John Wiley & Sons, New York, 1959.
3. H. A. Skinner, *Theory, Scope and Accuracy of Calorimetric Measurements*, u H. D. Brown (Uredn.), *Biochemical Calorimetry*, Academic Press, New York, 1969.
4. H. A. Skinner, J. M. Sturtevant, S. Sunner, *The Design and Operation of a Reaction Calorimeter*, u H. A. Skinner (Uredn.), *Experimental Thermochemistry*, Vol. 2, Interscience Publ., London, 1962.
5. P. C. Privalov, G. M. Monaselidze, G. M. Mrevlishvili, V. A. Mageladze, *J. Expt. Theoret. Phys. (SSSR)* 47 (1964) 2073.

Sažetak

U ovom radu govori se o mikrokalorimetriji, jednoj od novih znanstveno-istraživačkih tehnika. Prikazane su mogućnosti mikrokalorimetrije kao analitičke metode i kao metode za rješavanje pitanja kemijske termodinamike. Istaknute su prednosti mikrokalorimetrije za rad u biokemiji, makromolekularnoj kemiji, kemiji kompleksnih spojeva i biologiji. Opisani su suvremeni mikrokalorimetrijski uređaji i principi na kojima se oni snivaju.

6. M. J. O'Neil, *Anal. Chem.* 38 (1966) 1331.
7. E. Calvet, H. Prat, *Recent Progress in Microcalorimetry*, Pergamon Press, London, 1963.
8. T. H. Benzinger, C. Kitzing, u D. Glick (Uredn.), *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 8, Interscience Publ., New York, 1960, str. 309.
9. R. L. Biltonen, M. Flögel, *Calorimetric Studies of Protein-Inhibitor Interactions*, u pripremi za tisak.
10. R. Lumry, S. Rajender, *Biopolymers* 9 (1970) 1125.
11. J. Levy, *Disertacija*, The Johns Hopkins University, Baltimore, 1971.
12. C. Bjurulf, J. Laynez, I. Wadsö, *Eur. J. Biochem.* 14 (1970) 47.
13. D. W. Bolen, M. Flögel, R. L. Biltonen, *Biochemistry* 10 (1971) 4136.
14. P. Monk, I. Wadsö, *Acta Chem. Scand.* 23 (1969) 29.
15. J. Koničková, I. Wadsö, *Acta Chem. Scand.* 25 (1971) 2360.
16. P. Boivin, J. C. Garrigues, A. Grangetto, *C. R. Soc. Biol.* 162 (1968) 1770.
17. W. W. Forrest, *Bacterial Microcalorimetry*, u H. D. Brown (Uredn.), *Biochemical Microcalorimetry*, Academic Press, New York, 1969.
18. R. Eriksson, I. Wadsö, *First Europ. Biophysics Congress*, Wien, 1971.
19. J. E. Tillberg, A. Kylin, *LKB Application Note*, Nov. 9, 1970.
20. W. K. Lutz, P. U. Früh, W. Simon, *Helv. Chim. Acta* 54 (1971) 2767.
21. K. Levin, *Clin. Chim. Acta* 32 (1971) 87.
22. J. E. Letter, J. E. Bauman, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 443.
23. J. L. Meyer, J. E. Bauman, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 4210.
24. M. C. Lim, G. H. Nancollas, *Inorg. Chem.* 10 (1971) 1957.
25. J. P. Belaich, J. C. Sari, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 64 (1969) 763.
26. H. J. Möschler, H. G. Weder, R. Schwyzer, *Helv. Chim. Acta* 54 (1971) 1437.
27. P. U. Früh, J. T. Clerc, W. Simon, *Helv. Chim. Acta* 54 (1971) 1447.
28. G. Ojelund, I. Wadsö, *Acta Chem. Scand.* 22 (1968) 2691.
29. J. J. Christensen, R. M. Izatt, D. P. Wrathall, L. Hansen, *J. Chem. Soc. (A)* 1969, 1212.
30. J. J. Christensen, J. L. Oscarson, R. M. Izatt, *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968) 5949.
31. J. J. Christensen, M. D. Slade, D. E. Smith, R. M. Izatt, J. Tsang, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 4164.
32. J. J. Christensen, J. H. Rytting, R. M. Izatt, *Biochemistry* 9 (1970) 4907.
33. J. J. Christensen, J. H. Rytting, R. M. Izatt, *J. Chem. Soc. (B)* 1970, 1643.
34. R. M. Izatt, J. J. Christensen, J. H. Rytting, *Chem. Rev.* 71 (1971) 439.
35. G. D. Watt, J. M. Sturtevant, *Biochemistry* 8 (1969) 4567.
36. P. Greengard, S. A. Rudolph, J. M. Sturtevant, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 4798.
37. S. A. Rudolph, E. M. Johnson, P. Greengard, *J. Biol. Chem.* 246 (1970) 1271.
38. E. Strack, D. M. Müller, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352 (1971) 1014.
39. C. Bjurulf, J. Suurkuusk, I. Wadsö, *Proc. First Europ. Biophysics Congress*, Beč, 1971.
40. G. J. Papenmeier, J. M. Campagnoli, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 6579.
41. D. D. F. Shiao, J. M. Sturtevant, *Biochemistry* 8 (1969) 4910.
42. R. L. Biltonen, T. A. Schwarz, I. Wadsö, *Biochemistry* 10 (1971) 3417.
43. W. M. Jackson, J. F. Brandts, *Biochemistry* 9 (1970) 2294.
44. P. L. Privalov, N. N. Khechinashvili, B. P. Atanasov, *Biopolymers* 10 (1971) 1865.
45. T. Y. Tsong, R. P. Hearn, D. P. Wrathall, J. M. Sturtevant, *Biochemistry* 9 (1970) 2666.
46. G. Rialdi, P. Profumo, *Biopolymers* 6 (1968) 899.
47. G. M. Mrevlishvili, P. L. Privalov, u L. P. Kaynshin (Uredn.), *Water in Biological Systems*, Moskva, 1967, prijevod Consultants Bureau, New York, 1969, str. 63.
48. P. L. Privalov, *Biofizika* 13 (1967) 163.
49. C. V. Krishnan, H. L. Friedman, *J. Phys. Chem.* 73 (1969) 1572.
50. J. Koniček, I. Wadsö, *Acta Chem. Scand.* 25 (1971) 1541.
51. C. H. Spink, M. Auker, *J. Chem. Phys.* 74 (1970) 1742.
52. S. Subramanian, T. S. Sarma, D. Balasubramanian, J. C. Ahluwalia, *J. Phys. Chem.* 75 (1971) 815.
53. R. Lumry, R. Biltonen, *Aspects of Protein Conformations*, u G. Fasman, S. Timasheff, (Uredn.), *Biological Macromolecules*, Marcell Dekker, New York, 1969, Vol. 2, poglavlje 2.